

Ministério da Saúde



**COORDENAÇÃO DE ENSINO
EDUCAÇÃO PROFISSIONAL TÉCNICA DE NÍVEL MÉDIO EM CITOPATOLOGIA**

ANDRÉ GALDINO DA ROCHA

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

Rio de Janeiro

2019

ANDRÉ GALDINO DA ROCHA

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA e Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio - FIOCRUZ como requisito parcial para a conclusão do curso de educação profissional técnica de nível médio em citopatologia.

Orientador(a): Neimar de Paula Silva

Rio de Janeiro

2019

ANDRÉ GALDINO DA ROCHA

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

Aprovado em:

Grau:

BANCA EXAMINADORA

Profº _____.

Leandro Medrado

Profº _____.

Neimar de Paula Silva

Profº _____.

RESUMO

Câncer cervical é causado pelo Papilomavírus Humano (HPV), é uma das neoplasias mais comuns no mundo, é a segunda que mais importante entre as mulheres. No Brasil, o carcinoma de colo uterino ocupa o terceiro lugar no ranking de incidência com 16.370 novos casos, segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2018-2019, ficando responsável por 5.847 mortes no nosso país em 2016. Contudo esta é uma neoplasia prevenível, causada pelo HPV, e as formas de rastreamento dessa doença em fases iniciais, as quais se forem tratadas, tem grande chance de cura. O objetivo deste estudo é revisar os métodos de diagnóstico do HPV. Foi feita a revisão bibliográfica de literatura. A identificação direta de DNA ou RNA do HPV é a técnica mais indicada para detectar o vírus em amostras citológicas ou histológicas. Por ser bastante sensível, o uso desses métodos na detecção dos vírus de alto grau pode diminuir significativamente o número de pacientes com resultado falso-negativo ou indeterminado na citologia e serve ainda como marcador de cura pós-tratamento. Os testes moleculares para o HPV têm sido indicados como um instrumento de rastreio, com diversas vantagens. A detecção da infecção em estágio inicial, especialmente nas mulheres com HPV de alto risco carcinogênico, alerta para um acompanhamento mais frequente da clínica da paciente ou para o tratamento das lesões iniciais. Todas as técnicas mencionadas são apropriadas ao diagnóstico do HPV em pesquisa ou clinicamente. As técnicas de – Reação em Cadeia da Polimerase e Southern Blot são as mais sensíveis, Dot Blot e Captura Híbrida são aprovadas pela FDA.

Palavras-chave: Câncer cervical, Papilomavírus humano, HPV, Papanicolaou, Diagnóstico, Teste molecular.

ABSTRACT

Cervical cancer is caused by the Human Papillomavirus (HPV), which is one of the most common neoplasms in the world, it is the second most important among women. In Brazil cervix uterine carcinoma occupies third place in incidence's ranking with 16,370 new cases, according to the National Institute of Cancer Institute (INCA) for 2018-2019, being responsible for 5,847 deaths in our country in 2016. However this is a preventable neoplasm caused by HPV, and the early stages of screening for this disease, which if treated, have a high chance of cure. This study aims to review HPV diagnostic techniques. A review was done. The direct identification of HPV DNA or RNA is the best technique to detect the virus in cytological or histological samples. Because it is very sensitive, the use of these methods in the detection of high-grade virus can significantly decrease the number of patients with false-negative or undetermined results in cytology and still serves as a post-treatment cure marker. Molecular tests for HPV have been indicated as a screening instrument with several advantages. Early detection of infection, especially in women with high-risk carcinogenic HPV, alerts for more frequent follow-up of the patient's clinic or for treatment of early lesions. All of the above techniques are appropriate for the diagnosis of HPV in research or clinically. The polymerase chain reaction and Southern Blot techniques are the most sensitive; Dot Blot and hybrid capture are FDA approved.

Keywords: Cervical cancer, Human papillomavirus, HPV, Papanicolaou, Diagnosis, Molecular testing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	HPV: ASPECTOS BIOLÓGICOS E ONCOGÊNESE	7
1.2	CÂNCER CERVICAL	12
1.3	FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV	13
1.4	DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR HPV	14
1.5	JUSTIFICATIVA, OBJETIVO E METODOLOGIA	15
2	DESENVOLVIMENTO	16
2.1	TÉCNICAS MORFOLÓGICAS	16
2.1.1	Citologia ou Teste de Papanicolaou	16
2.2	TÉCNICAS MOLECULARES	17
2.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	18
2.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (PCR-Real Time – PCR-RT)	19
2.2.3	Captura Híbrida (CH)	20
2.2.4	Captura Híbrida II (CH-II OU CH2)	21
2.2.5	Southern Blot (SB)	21
2.2.6	Dot Blot (DB)	22
2.2.7	Microarranjo (Microarray) ou Hibridização em Fase Sólida	22
2.2.8	Hibridização <i>IN SITU</i>	22
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 HPV: ASPECTOS BIOLÓGICOS E ONCOGÊNESE

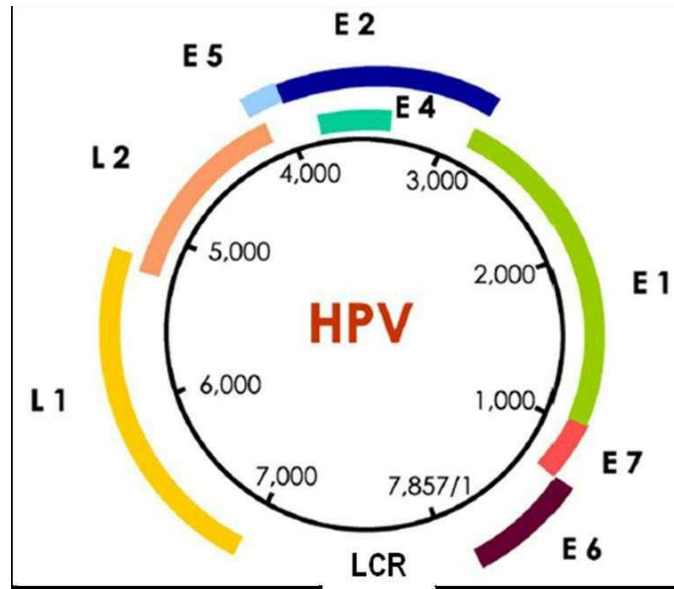
O Papilomavírus Humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, são pequenos (com diâmetro do capsídeo de 55 nm), icosaédricos, não envelopados, com ácido nucléico do tipo DNA (Ácido Desoxirribonucleico), sendo circular, constituído por dupla fita (Rubin, Emanuel et al., 2006), composta por cerca de 7.200 a 8.000 pares de bases e peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons. Os vírus de HPV recebem a classificação com base no seu DNA, cada tipo tem o seu genótipo característico (XAVIER et al., 2007).

É de suma importância citar a observação de Lindemberger (2007), de que estes vírus são divididos em grupos conforme o seu genótipo e a sua oncogenicidade, ou seja, sua capacidade de originar, produzir ou causar a proliferação de uma neoplasia.

O genoma do HPV pode ser destacado em três partes, sendo duas codificantes intercaladas por uma regulatória não codificante, que são elas: região precoce (Derchain et al., 2005), (do inglês “Early” – E1 a E8), região tardia (L) (“Late” – L1 e L2) e região reguladora URR ou LCR (“long control region”) (FIGURA 1).

Os genes L (L1 e L2) codificam as proteínas estruturais do capsídeo. Os genes E1 e E2 estão relacionados à replicação do vírus. Os genes E5, E6 e E7 codificam proteínas causadoras da transformação da célula, ou seja, carcinogênese (LINDEMBERGER et al, 2012).

Figura 1 – Representação do genoma do HPV e o arranjo das regiões genômicas “E”, “L” e a “LCR”. Fonte: MUÑOZ et al., 2006



Há uma grande quantidade de tipos de HPV. Até agora são mais de 200 já identificados pelo meio de análises das sequências de DNA. A maioria dos subtipos está relacionada com lesões benignas tais quais as verrugas cutâneas, entretanto um certo número de tipos está frequentemente relacionado à carcinogênese do colo uterino. As associações com diferentes tipos de lesão se dão pelo seu crescimento diferenciado e ao seu potencial carcinogênico. Consta-se que a nova formação de partículas virais nas células hospedeiras está fortemente ligada ao processo de diferenciação dos queratinócitos. Os critérios para divisão em tipos repousa na determinação do grau de homologia entre os genomas virais – hibridização cruzada abaixo de determinada porcentagem implica a consideração de novo tipo (ARAUJO 2012).

Compreende-se que não são todos os tipos de HPV que causam lesões celulares, aqueles tipos que as provocam estão colocados no grupo chamado de alto risco oncogênico. Também não significa dizer que todas as lesões são cancerosas, as lesões iniciais, se não tratadas podem evoluir para o tumor (CFM, 2002).

Dentre os inúmeros tipos de HPV, aproximadamente 40 estão associados ao trato anogenital e 20 estão relacionados com o câncer de colo do útero

(LINDEMBERGER et al, 2012). Porém, dentre esses 40, podemos dividi-los em grupos de acordo com o seu potencial oncogênico.

Há algumas divergências em relação a alguns tipos, no entanto em geral é dividido da seguinte forma: Baixo risco – 6, 11, 42, 44, 43, 54, 26, 70, 73, 13, 32, 34, 40, 53, 55 e 63, sendo os tipos 6 e 11 os principais, localizados em lesões benignas, na maior parte dos condilomas genitais e em papilomas laríngeos; Alto risco – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 66, 68, 52, 70 e 55, sendo os tipos 16 e 18 os principais, encontrados na maioria dos tumores malignos (CFM, 2002; NORONHA et al., 2005; XAVIER et al., 2007; BRINGHENTI et al., 2012).

Os vírus entram nas células epiteliais e podem gerar manifestações clínicas como lesões em peles e mucosas, contudo essas infecções não necessariamente causam os carcinomas e as verrugas, também chamadas condilomas acuminados ou popularmente conhecidas como crista de galo. O indivíduo infectado pode não exibir manifestações clínicas, sendo isento de lesões macroscópicas, a esse tipo de infecção chamamos de assintomática, latente, ou subclínica (MINISTERIO DA SAUDE 2017).

A infecção pode ser qualificada em três estágios: latente– quando a infecção só pode ser detectada por testes moleculares, tem o vírus, mas não há lesão; subclínica – quando a pessoa não exibe sintomas clínicos, porém podem-se constatar alterações leves através de colposcopia; clínica – quando há lesões facilmente identificáveis com o exame clínico (XAVIER et al., 2007).

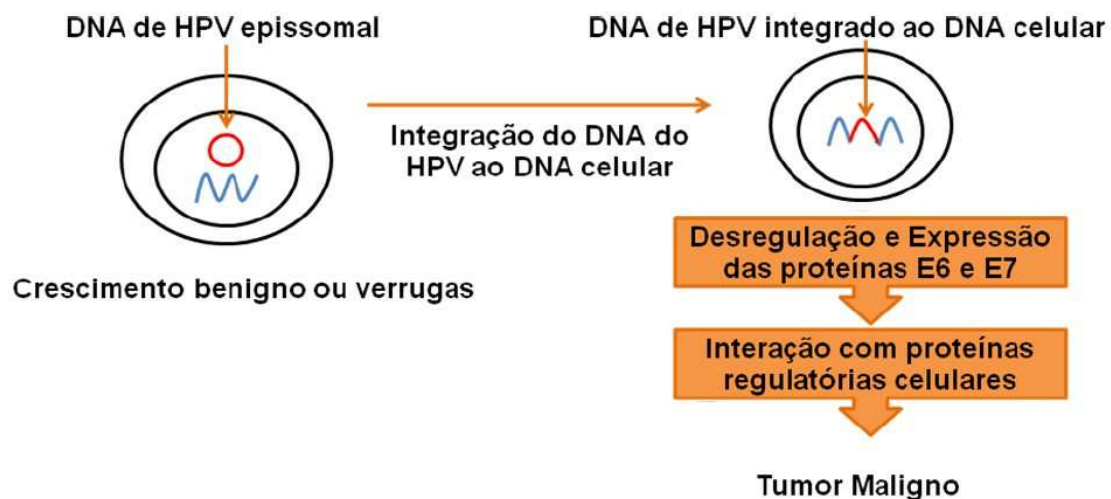
Xavier (2007) também discorre que a maioria das mulheres infectadas pelo HPV não apresentam manifestações clínicas. Porém em alguns casos, a infecção comumente aumenta de forma limitada, evolui lentamente, é auto resolutiva, transiente, geralmente evolui naturalmente (Noronha et al., 2005) sem nenhum método terapêutico em até 80% dos casos, sendo bastante baixa a quantidade de infecções com lesões aparentes – 1 a 2% .

É necessário frisar que a maior parte das infecções por HPV são transitórias e a maioria delas regride, porém a consequência extrema da infecção pelo HPV é o câncer cervical e, por conta disso, as mulheres devem se prevenir das diversas formas. Por ser uma IST, a infecção pode ser evitada com o uso de preservativo, sendo a principal forma de prevenção (CFM, 2002).

É de grande relevância citar que a infecção por HPV é uma infecção sexualmente transmissível (IST) – antigamente chamada de Doença Sexualmente Transmissível (DST) –, bastante incidente, sendo a mais frequente, aparecendo em cerca de 10% a 20% da população sexualmente ativa e citado por Nonnenmacher e colaboradores (2001) e que seu agente está intimamente relacionado com o câncer cervical. No entanto, além dos tumores malignos, há também outras formas de manifestações clínicas causadas pelo HPV, como os sintomas mais frequentes nos indivíduos infectados estão os tumores genitais benignos (XAVIER et al., 2007).

As alterações neoplásicas estão relacionadas às proteínas produzidas pelos genes E6 e E7 que modificam a regulação do crescimento celular. Foi observado que as proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 se ligam às proteínas p53 e Rb, respectivamente, interferindo na divisão celular. Nas lesões benignas, o genoma do HPV é separado do DNA da célula e fica como um plasmídeo. Em contrapartida, nas lesões malignas o DNA do vírus se integra ao DNA da célula hospedeira (RIVOIRE et al., 2001) (FIGURA 2).

Figura 2 – Tipos de Interação do DNA do HPV com o DNA da célula. Fonte: ALBERTS et al., 1994.



A incorporação do genoma viral ao da célula hospedeira e em seguida a expressão das proteínas E6 e E7 são formas de ativação para o desenvolvimento do câncer. O período de incubação da infecção é incerto e ainda não se sabe precisamente o que faz uma infecção por HPV permanecer latente e outra causar lesões. A presença do HPV não determina que haja lesão maligna; o

desenvolvimento do câncer acontece em um percentual bastante pequeno de pessoas infectadas e depende de alguns outros fatores (WOLSCHICK et al., 2007).

Em 1995, Bosch e colaboradores realizaram um pesquisa multicêntrica em 22 países sobre a prevalência do HPV em mulheres com câncer invasivo. Os resultados demonstraram a existência da associação do HPV com a neoplasia cervical, cuja prevalência do DNA viral foi de 92,2%. Observou-se também que o carcinoma cervical com maior frequência foi o carcinoma escamoso (94,5%). Outro dado importante desse trabalho foi à relação do tipo viral com o local do câncer cervical. O "HPV 16" foi encontrado em 68% dos carcinomas escamosos e o "HPV 18" foi encontrado em 71% dos adenocarcinomas e em 71% de carcinoma adenoescamoso. Não houve uma associação entre a extensão da doença e os tipos virais. De acordo com a distribuição geográfica do vírus, houve uma variação dos tipos dos vírus encontrados, mas o HPV 16 foi o mais predominante nos países onde aconteceram as pesquisas. A partir desse estudo a comunidade científica mundial estabeleceu a relação causal do vírus HPV com o câncer de colo do útero e reconheceu os tipos 16 e 18 como os tipos com maior potencial oncogênico.

O HPV está profundamente ligado ao câncer cervical cumprindo papel fundamental na oncogênese, surgindo em estudos que comprovam relação de 99,7% dos casos desse câncer em todo o mundo. O fator de risco mais importante para a evolução ao câncer cervical é a alteração das células epiteliais pelo HPV transformando-as em neoplásicas (BRINGHENTI et al., 2012).

CFM (2002) descreve que é 19 vezes mais provável que mulheres com HPV desenvolvam o câncer cervical do que aquelas que não possuem o vírus. Caso elas possuam os tipos 18, 31 ou 33 (alto risco oncogênico), essa possibilidade pode aumentar para 50 vezes e quando analisado o tipo 16 (também de alto grau), essa probabilidade subiu mais de 100 vezes.

De acordo com CFM (2012), mulheres ainda jovens infectadas por determinados tipos de HPV têm maior risco de desenvolver carcinoma, uma parcela bem menor que 1% das infectadas por vírus do grupo de alto risco irá evoluir para tal neoplasia. A detecção da infecção em estágio inicial, especialmente das mulheres com HPV de alto risco carcinogênico, alerta para um acompanhamento e tratamento mais frequente das lesões iniciais ou da clínica da paciente (BRINGHENTI et al., 2012).


1.2 CÂNCER CERVICAL

O câncer de colo uterino, que também pode ser chamado de cervical, é uma das neoplasias mais comuns em todo o mundo, é a segunda que mais atinge as mulheres, 500.000 a cada ano exibem essa neoplasia e aproximadamente 50% morre em decorrência dela (BRINGHENTI et al., 2012).

Analisando a América Latina, podemos perceber que essa neoplasia é a segunda mais comum e possui a segunda maior taxa de mortalidade de câncer na população feminina (Derchain et al., (2005); e no Brasil, o carcinoma uterino ocupa o terceiro lugar no ranking das neoplasias com 16.370 novos casos, segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2018-2019, tendo sido responsável por 5.847 mortes de mulheres por neoplasias em 2016 (INCA, 2018) (QUADRO 1).

Em nosso território, de acordo com as estimativas do (INCA) para o biênio de 2018-2019, apontam a ocorrência de aproximadamente 600.000 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes nas mulheres serão os cânceres de pele não melanoma (83 mil casos novos), mama (59 mil), cólon e reto (18 mil), colo do útero (16 mil) e pulmão (12mil), (INCA, 2018).

Quadro 1 – Contagem total e proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018/2019 em mulheres, exceto pele não melanoma Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA 2018b)

Mulheres	Localização Primária	Casos novos	%
	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Bringhenti et al (2012), destaca que embora haja números alarmantes, o câncer cervical é uma neoplasia evitável, causada pelo HPV e a detecção precoce dessa doença seguida de tratamento em tempo oportuno diminuem consideravelmente as chances de evolução da doença e consequentemente garantem altas taxas de cura. Este é o tipo de câncer que tem maior possibilidade de prevenção e cura quando encontrado no início.

1.3 FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV

Os fatores de risco para infecção pelo HPV são: sexarca precoce (início de atividades sexuais muito cedo), tabagismo, estado imunológico deficiente, números de parceiros sexuais, alta paridade, níveis de escolaridade e socioeconômico baixos (DERCHAIN et al., 2005; NONNENMACHER et al., 2001; RIVOIRE et al., 2001).

Um estudo que avaliou a presença do HPV em pelos pubianos descreveu que em amostras extraídas da região anogenital de pessoas infectados por HPV, 36% dos casos de região pubiana e 50% de região perianal tinham o DNA de HPV 6 e 11. Dentre os casos do estudo dois que foram tratados com sucesso e sem manifestação clínica da doença mostraram resultado positivo para o DNA do HPV

correspondente, lembrando-se que o vírus continuou no local mesmo depois do tratamento (ARAUJO 2012).

A transmissão do HPV se dá, sobretudo, por via sexual, contudo não é a única via. O contágio pode ocorrer através de autoinoculação, contato orogenital e via materno-fetal durante período gestacional ou parto. Desse modo, uma importante forma de prevenção é o uso de preservativo (BRASIL, 2007; LINDEMBERGER et al, 2012).

Outra forma de se prevenir é fazendo o uso da vacina profilática (preventiva) que impede a infecção pelo HPV. Apesar de essa afirmação parecer redundante, há ainda as vacinas terapêuticas (curativas) usadas para o tratamento de pacientes proporcionando a regressão de lesões pré-malignas ou câncer cervical (LINDEMBERGER et al, 2012). O Ministério da Saúde disponibiliza estas vacinas profiláticas, as quais também podem ser encontradas em clínicas particulares.

De acordo com Ministério da saúde meninas entre 9 e 14 anos e meninos com idade entre 11 e 14 anos podem receber a vacina contra o HPV gratuitamente pelo SUS. A vacina disponibilizada pelo SUS é a quadrivalente, ou seja, protege os imunizados da infecção pelos subtipos 6,11,16 e 18 do HPV, mas não de todos os subtipos do vírus nem das demais infecções sexualmente transmissíveis (IST); por isso, a indicação é a utilização de preservativo nas relações sexuais (BRASIL, 2017).

1.4 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR HPV

Para Syrjanem (2005), há inúmeras formas de se detectar a infecção por HPV e cada exame pode cooperar com o diagnóstico da doença, assim evitando o câncer cervical. Os testes podem ser por pesquisas diretas ou indiretas, procurando respectivamente o vírus ou alterações geradas por ele.

Derchain (2005) descreve que o teste morfológico considera a existência de células atípicas, inferindo lesões precursoras de câncer. Esse tipo de teste não pesquisa a presença de HPV, mas as alterações celulares ocasionadas pelo mesmo. Enquanto as técnicas morfológicas advertem, as moleculares garantem. Somente os métodos moleculares detectam o DNA do vírus, assim confirmando a infecção pelo HPV, mesmo que ainda não tenha alteração celular (WOLSCHICK et al., 2007).

1.5 JUSTIFICATIVA, OBJETIVO E METODOLOGIA

Embora os programas de controle do câncer do colo do útero sejam bastante difundidos, essa neoplasia ainda representa um grave problema de saúde pública, sobretudo nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. As taxas específicas de incidência e mortalidade continuam elevadas, o que justifica a necessidade de revisar os métodos diagnósticos da infecção pelo HPV visto que isso contribuiria na redução de diagnósticos falso-negativos e implicaria em alertar o sistema de saúde para um acompanhamento mais criterioso das pacientes com resultados positivos para HPV.

O objetivo deste estudo é revisar os métodos de diagnóstico do HPV.

Para isso utilizou-se de uma revisão bibliográfica de literatura que avaliou artigos publicados no período de 2000-2018. As bases de dados científicas utilizadas foram: Medline, Lilacs, Bireme, Scielo. As buscas foram realizadas utilizando os seguintes descritores: Câncer cervical, câncer do colo do útero, Papilomavírus humano, HPV, neoplasia, citologia, diagnóstico molecular, testes moleculares, PCR, hibridização, blotting. Foram usados mais artigos descobertos por meio das referências dos artigos lidos, bem como visitas a sites oficiais, tais como: (Organização Mundial de Saúde – OMS, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, Ministério da Saúde – MS) e livros da área médica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 TÉCNICAS MORFOLÓGICAS

Dentre os métodos morfológicos, a citologia é o mais utilizado no dia a dia para o diagnóstico do HPV pelo meio da observação microscópica das lesões celulares provocadas pelo vírus (SYRJANEN et al., 2005; CARNEIRO et al., 2006).

2.1.1 Citologia ou Teste de Papanicolaou

O teste de Papanicolaou, conhecido popularmente como o exame preventivo, citologia oncológica ou exame citopatológico; se constitui como o exame mais usado para a prevenção do câncer do colo do útero (DERCHAIN et al., 2005). Este teste foi desenvolvido por George N. Papanicolaou em 1939 e é realizado como rotina. Para a realização do exame é feita a coleta de material no colo do útero, a coloração do material e análise microscópica com a finalidade de detectar células anormais, indicando lesões precursoras desta neoplasia (SYRJANEN et al., 2005).

Informações do INCA (2005) relatam que essas alterações celulares podem ser visualizadas no exame preventivo, quando ainda são lesões precursoras, são curáveis na totalidade dos casos; daí concluímos; que é de extrema importância a realização periódica deste exame.

A terminologia empregada para o teste variou com o passar do tempo; desde a classificação de Papanicolaou (1943), a nomenclatura foi modificada várias vezes; atualmente e por convenção, ficou acordado que ao Sistema Bethesda seja incorporado aos laudos (SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE CITOPATOLOGÍA, 2013)

A lesão intra epitelial escamosa (SIL) compreende irregularidades não invasivas, cervicais, escamosas, epiteliais associadas ao HPV, que podem variar desde alterações celulares associadas a uma infecção transitória do HPV até alterações celulares anormais de alto grau que apontam um risco elevado de evolução para um câncer escamoso invasivo (INCA 2018).

Dentro do Sistema Bethesda (TBS), essas irregularidades se dividem nas categorias de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL). As lesões de baixo grau (LSIL) compreendem as alterações celulares chamadas de diferentes maneiras de “efeito

citopático do HPV” (coilocitose) e uma displasia leve ou neoplasia intra epitelial cervical (NIC) 1. As lesões de alto grau (HSIL) incluem displasia moderada, grave e carcinoma *in situ* ou NIC 2, 3 (SOLOMON; NAYAR, 2005).

O exame citológico tem alta especificidade, mas sensibilidade limitada, já que os resultados podem sofrer alteração quanto à interpretação dos leitores das lâminas. Esse teste não pesquisa o vírus HPV, porém analisa as alterações celulares provocadas pelo vírus. Essa técnica pode ser realizada em lâmina ou em meio líquido fixador. O custo da citologia do segundo tipo é consideravelmente mais elevado, no entanto possui a vantagem de ter maior representatividade de células coletadas e transferidas para a lâmina, redução dos resultados insatisfatórios, maior sensibilidade para detecção de lesões de alto grau e possibilidade de aproveitar o material restante para fazer testes moleculares (DERCHAIN et al., 2005).

A citologia, mesmo sendo tão importante como exame preventivo para o diagnóstico precoce do câncer cervical, não consegue diferenciar qual lesão irá progredir ou regredir; a partir daí, citamos e reforçamos a importância dos exames complementares como, por exemplo, dos testes moleculares (BRINGHENTI et al., 2012).

2.2 TÉCNICAS MOLECULARES

Existem diversas técnicas moleculares de detecção de HPV. Atualmente a identificação direta de DNA ou RNA do HPV é a técnica preferida para detectar o vírus em amostras citológicas ou histológicas. Por ser bastante sensível, o uso desses métodos na detecção dos vírus de alto grau pode diminuir significativamente o número de pacientes com resultado falso-negativo ou indeterminado na citologia e ainda serve também como marcador de cura pós-tratamento (WOLSCHICK et al., 2007).

Syrjanem (2005) destaca que a busca pelo HPV por diferentes testes moleculares, tem sido indicado como uma ferramenta de rastreio auxiliar ou independente; porém o uso da citologia e da biologia molecular quando são associadas pode melhorar o acompanhamento dessas neoplasias. Rivoire e colaboradores (2001) sugerem um aumento na sensibilidade e no valor preditivo negativo para quase 100%, sinalizando para que mulheres com os dois testes negativos possam ter o próximo teste postergado; contudo o custo dos testes

moleculares ainda são um impedimento para a seu uso em programas de rastreamento

Os inúmeros testes desse tipo são indicados para o rastreamento e genotipagem do HPV em mulheres com a finalidade de identificar quais têm um maior risco de desenvolver o câncer cervical. As técnicas de hibridização se fundamentam no fato de que duas fitas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) com sequências complementares tendem a se ligar e formar uma dupla fita. Diversos testes de hibridização estão disponíveis comercialmente e têm diferenças com relação a: utilização, especificidade, sensibilidade e custo (WOLSCHICK et al., 2007).

Resultados positivos para o vírus HPV pelo meio das técnicas moleculares em mulheres com o resultado citológico normal é visto como caso de latência clínica. Pesquisas apontam que o vírus pode ser encontrado em quantidade considerável de mulheres sexualmente ativas neste estado de latência, contudo encontramos divergências de dados dos autores quanto ao número de mulheres infectadas na fase de latência que varia de 10% a 80% (NORONHA et al., 2005).

2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um teste de alta sensibilidade (a mais sensível e disponível atualmente) é usado especialmente em pesquisas para conferir se há DNA do vírus. Essa técnica se fundamenta na amplificação de quantidades muito pequenas de sequências específicas do DNA viral em milhões de vezes (BIGIO et al., 2002). Ainda segundo Bigio, sua alta sensibilidade é também uma desvantagem já que, por conta disso, há uma maior quantidade de resultados falso-positivos oriundos de reação cruzada.

No entanto o PCR ainda não foi aprovada como método de diagnóstico clínico para HPV pelo Food and Drug Administration (FDA) mesmo que seja bastante utilizada em pesquisa (BIGIO et al., 2002).

Esse teste torna possível a genotipagem do HPV por meio da amplificação de regiões específicas para cada um dos vírus de alto ou baixo grau (normalmente sequências dos genes E6 e E7 dos subtipos de HPV) e para (Bringhent (2012), o uso de primers universais possibilita, em tese, a detecção de todos os tipos de HPV).

Analisando material de citologias falso-negativas, colhidas até seis anos antes do aparecimento da neoplasia, constatou-se a existência de DNA viral na maior parte dos esfregaços, especialmente dos tipos 16 e 18. Em grande parte das mulheres foi analisado que o DNA viral achado foi igual ao da lâmina de citologia e das biópsias e compreende-se que houve uma boa correlação quando comparados os resultados das técnicas e a partir do que foi exposto, percebe-se que os resultados falso-negativos da citologia devem ser minimizados caso essa técnica seja usada juntamente com a PCR (CFM, 2002).

Estudos examinaram que o DNA do vírus de alto risco nem sempre é detectado no sangue de mulheres com câncer de colo uterino por meio do método de PCR. Em razão do ciclo de vida do vírus ocorrer unicamente dentro dos tecidos epiteliais, o vírus do HPV não é encontrado com frequência no sangue. Mas algumas conjecturas sugerem o rompimento das células neoplásicas devido à necrose ou apoptose, ou ainda à existência de micrometástases. Dessa forma, o achado de DNA viral localizado na corrente sanguínea poderia se tornar resultado como método diagnóstico não-invasivo prognóstico de seguimento (WOLSCHICK et al., 2007).

2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (PCR-Real Time – PCR-RT)

A técnica de PCR em tempo real (PCR-TR) é um variante do método convencional que permite diferenciar as sequências de bases amplificadas de DNA. As reações ocorrem em capilares fechados que conseguem de maneira eficiente a transferência de calor, elevando a eficácia da amplificação e minimizando as contaminações. Foi possível “observar” a reação acontecendo dentro do tubo e seguir o resultado à medida que as reações são feitas. Essa técnica é chamada de homogênea, pois se trata de juntar as fases de amplificação e análise em uma etapa única, dessa forma, contribuiu para diminuir o tempo para obtenção do resultado (RODRIGUES et al., 2009).

A PCR em tempo real capta sinais fluorescentes resultantes das reações de PCR e como descrito por Barra (2011), as análises podem ser qualitativas ou quantitativas já que os sinais fluorescentes são convertidos em números.

2.2.3 Captura Híbrida (CH)

No Brasil essa técnica é utilizada para detecção do HPV, é exclusiva para detecção clínica do vírus em material cervical aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Food and Drug Administration (FDA). Essa técnica agrega métodos de hibridização molecular e antígenos monoclonais. Este é o exame, ele tem altas sensibilidade e especificidade para detecção do DNA do vírus, tanto do grupo (baixo ou alto risco) quanto da carga viral (CFM, 2002).

De início ocorre a desnaturação do DNA da amostra, o DNA viral é hibridizado com inúmeras sondas de RNA, em um tubo contendo solução tampão. A sonda mista de RNA que detecta os tipos de HPV de baixo risco é chamada de sonda A e a que reconhece os tipos de HPV de alto risco é denominada sonda B. Pode-se usar as duas sondas concomitante ou separadamente. Essa técnica diferencia o grupo, porém não distingue o tipo (WOLSCHICK et al., 2007).

Os híbridos de RNA-DNA são fixos sob uma superfície sólida de poços de uma microplaca e cobertos com anticorpos específicos para híbridos de RNA-DNA. Os híbridos capturados são expostos a um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina, e detectados por um sensível sistema de amplificação de sinal quimioluminescente.

A utilização de microplacas possibilita a automatização do teste, Barra e colaboradores (2011) chegaram à conclusão, que este teste é qualitativo e quantitativo, ou seja, informa a que grupo a sua carga viral pertence (NONNENMACHER et al., 2001).

A CH não é usada no rastreamento da infecção, sua utilização é para: auxiliar no diagnóstico do HPV diferenciando as infecções de baixo e alto risco, rastreamento de pessoas com citologia indeterminada e a análise dos casos de mulheres com lesões de baixo grau, mas com HPV de alto risco oncogênico, assim prevenindo a evolução para o câncer (WOLSCHICK et al., 2007).

Importante frisar que essa técnica vem sendo substituída por métodos que incluem a genotipagem do HPV e pelo PCR tempo real (BARRA et al., 2011).

2.2.4 Captura Híbrida II (CH-II OU CH2)

A versão captura híbrida II (CH2) é utilizada clinicamente na busca pelo HPV, em complemento à citologia. Esta técnica esta baseada na hibridização do DNA viral, usando sondas bem específicas contra os tipos de HPV de alto risco exclusivamente, porém não distingue o tipo específico do vírus e nem consegue detectar todos os tipos de HPV de alto risco. A sensibilidade do ensaio pode não ser o suficiente para perceber a existência do vírus no começo da infecção (RODRIGUES et al.,2009).

2.2.5 Southern Blot (SB)

Utiliza-se para pesquisa de DNA do HPV para diagnóstico clínico. Os resultados desse ensaio são qualitativos e essa técnica é composta pelas seguintes etapas: extração do DNA, digestão DNA, preparo da sonda, transferência, hibridização e detecção. O DNA extraído da amostra é digerido por enzimas de restrição, permanecendo dividido em pedaços de tamanhos diversos os quais são separados por eletroforese; porém é importante citar que cada tipo de HPV tem um padrão de fragmentação específico (WOLSCHICK et al., 2007).

A passagem dos produtos da PCR é feita depois da eletroforese; os géis da PCR são submetidos à desnaturação alcalina e em seguida, faz-se a neutralização (com tampão fosfato), e depois os ácidos nucleicos são transferidos para uma membrana de nitrocelulose (ou, alternativamente, nylon) carregada positivamente pelo meio de sucção ou com a ajuda de uma pilha de toalhas de papel. Contendo os produtos transferidos do gel, as membranas são hibridizadas com as sondas específicas. A membrana será incubada com anticorpos quimioluminescentes e mostrada através de autorradiografia ou com a utilização de contracorantes (BARRA et al., 2011).

Esse teste tem alta sensibilidade podendo detectar uma cópia do vírus por célula e diferencia os tipos de HPV, entretanto, é um método muito complexo, bem demorado e necessita de amostra fresca, o que impossibilita a sua utilização na prática clínica (BIGIO et al., 2002).

2.2.6 Dot Blot (DB)

Esse teste é a simplificação do SB, é veloz, de baixo custo, fácil, e tem sensibilidade semelhante à do SB. O FDA aprovou a utilização desse teste para diagnóstico clínico; ele pode detectar DNA ou RNA do vírus. O material genético do HPV é retirado e aplicado em gotas diretamente sobre o filtro de nitrocelulose. Da mesma maneira que o SB, a manifestação é feita por autorradiografia ou uso de contra corantes; outra vantagem que podemos destacar dessa técnica, que é possível conseguir alta quantidade de amostras em um único experimento (BIGIO et al., 2002).

2.2.7 Microarranjo (Microarray) ou Hibridização em Fase Sólida

Para aumentar a utilidade diagnóstica de um teste molecular, existe atualmente um grande interesse nas reações "multiplex", assim, haverá a possibilidade de realizar por essa técnica a genotipagem do HPV. O intuito dessa técnica é bem semelhante às de blot, entretanto realizam-se diversas análises de hibridização de DNA/RNA paralelamente e em uma forma diminuta. A análise dessas reações de hibridização normalmente está envolvida com a captação do sinal luminoso provocado pela ligação da sequência de DNA/RNA alvo marcado fluorescentemente com as sondas no micro arranjo; um scanner de fluorescência é usado para analisar o resultado (BARRA et al., 2011).

Barra e colaboradores (2011), ainda acrescenta que a hibridização contra um sítio exclusivo do micro arranjo admite a identificação do genótipo do vírus que aparece na amostra. Uma das principais vantagens da genotipagem de HPV por esse método é a possibilidade de detectar infecções múltiplas, que na maioria das vezes está associada a risco mais elevado de desenvolvimento para o câncer do colo uterino.

2.2.8 Hibridização *IN SITU*

Esse método exhibe o DNA/RNA do vírus na célula, pode ser feito com amostras de exames citológicos ou histológicos, além de permitir a análise concomitante das alterações celulares e da existência do vírus pelo meio da hibridização com sondas marcadas. Sua revelação se dá por autorradiografia,

fluorescência ou detecção de um produto colorido. Para a detecção do HPV, os métodos enzimáticos são considerados melhores devido à fácil interpretação. As características do sinal (difuso ou pontual) podem mostrar o estado físico do DNA do HPV. Adicionalmente, a intensidade desse sinal pode ser convertida em valores numéricos, relacionados aos números de cópias virais. Essa técnica é bem menos sensível que a PCR e a CH; além de não fazer a tipagem do HPV, havendo necessidade de realização de outro método (WOLSCHICK et al., 2007).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A citologia utilizada para a detecção do HPV é um exame importantíssimo, sendo o mais utilizado na rotina clínica, contudo a associação deste com os testes moleculares fica melhor para diagnóstico precoce. Com o progresso da tecnologia, novas técnicas são criadas ou melhoradas com o intuito de nos fornecer dados mais precisos.

Todas essas técnicas citadas são apropriadas ao diagnóstico do HPV; salientando que as de PCR e SB são as mais sensíveis, avaliada como padrão “ouro”, entretanto ela é utilizada prioritariamente em pesquisas devido à sensibilidade e à complexidade, respectivamente. Torna-se importante aqui destacar que a Hibridização *in situ* tem o benefício de poder ser realizado com amostras citológico-histológicas e permitir a detecção do vírus junto às alterações celulares.

A discussão dos métodos diagnóstico da infecção pelo HPV é de grande importância para melhoria do acesso ao diagnóstico das pacientes portadoras do HPV, o diagnóstico preciso dessa infecção contribui para o segmento e tratamento adequados das pacientes, o que, em última instância, garante o melhor cuidado e uma consequente redução da morbimortalidade por câncer do colo do útero.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASIL. Senado: Meninas poderão receber na rede pública vacina contra HPV. Agência Brasil. Brasília. 2012. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2012-09-12/senado-meninas-poderao-receber-na-rede-publica-vacina-contrahpv>>.

AGÊNCIA BRASIL. Vírus causador de câncer no útero também pode afetar homens e bebês. Brasília. 2007. Disponível em <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2007-02-03/virus-causador-de-cancer-no-utero-tambem-pode-afetar-homens-e-bebes>>.

AGÊNCIA BRASIL. Vacinação contra o HPV começa na próxima semana. Brasília. 2014. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2014-03/vacinacao-contrao-hpv-comeca-na-proxima-semana>>.

AGÊNCIA BRASIL. Campanha de vacinação contra HPV tem baixa procura este ano. Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-06/especialistas-destacam-baixa-procura-por-vacina-contrahpv-em-dia-del>>.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. 3 ed. New York: Garland, 1994.

ARAUJO, SAMUEL REGIS. Citologia cervico vaginal passo a passo 2.ed. Rio de Janeiro, 2012. 195p.

BARRA, G. B.; CAIXETA, M. C. S. A. S. B.; COSTA, P. G. G.; SOUSA, C. F.; VELASCO, L. F. R.. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v 43, n. 3, p. 254-260, 2011.

BIGIO, C. T.; BARBOZA, F. A.; CAVALCANTI, S. M. B.. Detecção e Tipagem viral para papilomavírus humano: progressos recentes e perspectivas clínicas. Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. v. 04, n. 14, p.32-35, 2002.

CARNEIRO, S. S.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I.; CONSOLARO, M. E. Contribuição da citologia de Papanicolaou para o diagnóstico de leveduras em secreção vaginal. Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, v. 18, n. 1, p. 36-40, 2006.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (CFM). Projeto diretrizes, Papilomavírus humano (HPV): diagnóstico e tratamento. p 1-19, 2002.

BRINGHENTI, M. E. Z.; DOZZA, T. G.; DOZZA, T. G.; MARTINS, T. R.; BAZZO, M. L. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da citologia oncótica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do papilomavírus humano (HPV). Jornal de Doenças Sexualmente Transmissíveis. v. 3, n. 22, p.135-140. 2012

DEMAY, R. M. Practical Principles of Cytopathology Revised Edition. American Society for Clinical Pathology, 2 ed. 2010.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018. Rio de Janeiro. 2018. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/tabelaestados.asp?UF=BR>>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018. Rio de Janeiro. 2018. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/tbregioes_consolidado.asp>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Câncer: Tipos de Câncer Colo do útero. Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterо/definicao>.

LINDEMBERGER, A.; OLIVEIRA, C. F.; CORREA, M. P.; REUS, T. L.; ODA, J. M. M.; CARNEIRO, N. K.; WATANABE, M. A. E. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papilomavírus humano (HPV). Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. v. 33, n. 1, p. 111-122, 2012.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A. B. DE; GISSMANN, L. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, 24(3), p. 3- 10, 2006.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). HPV e Câncer – Perguntas Mais Frequentes. 2015. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2687>.

DERCHAIN, S. F. M.; LONGATO FILHO, A.; SYRJANEN, K, J. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, [s.l.], v. 07, n. 27, p.425-433, 2005.

MIRANDA, G. H. B. Método para processamento e análise computacional de imagens histopatológicas visando apoiar o diagnóstico de câncer de colo do útero. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L.; PROLLA, J. C.; BOZZETTI, M. C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. Revista de Saúde Pública, [s.l.], v. 01, n. 36, p.95-100, 14 nov. 2001.

NORONHA, V. L.; NORONHA, R.; CARMONA, B.; MACEDO, L. A.; CRUZ, E. M.; NAUM, C.; MELLO, W.; VILLA, L. Papilomavírus humano (HPV) em mulheres com citologia oncótica dentro dos limites da normalidade. Jornal de Doenças Sexualmente Transmissíveis, [s.l.], v. 01, n. 17, p.49-55, 2005.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; SILVA, I. S. B. Bases Moleculares da Oncogênese Cervical. Revista Brasileira de Cancerologia, [s.l.], v. 02, n. 47, p.179-184, 2001.

RODRIGUES, A. D.; CANTARELLI, V. V.; FRANTZ, M. A.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F. S. Comparação das técnicas de captura de hídridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. [s.l.], v.45, n. 6, p.457-462, dez. 2009.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F. (Ed.). Rubin Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina. 4. ed. [s.l.]: Guanabara Koogan, 2006.

SENADO. Imunização de meninas contra HPV pelo SUS é aprovada em turno suplementar. Brasília. 2017. Disponível em:

<http://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2017/09/12/imunizacao-contr-o-hpv-pelo-sus-e-aprovada-em-turno-suplementar>.

SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE CITOPATOLOGÍA. Manual de Citopatologia Diagnóstica. Barueri. 1. ed.Barueri,SP. Manole. 2013. 61 p.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal: Definições, Critérios e Notas Explicativas. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.89 p.

World Health Organization (WHO). Cancer mortality and morbidity. Genebra. [2012]. Disponível em:

http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html.

WOLSCHICK, N. M.; CONSOLARO, M. E. L.; SUZUKI, L. E.; BOAER, C. G. Câncer de colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v. 39, n. 02, p.123-129, 2007.

World Health Organization (WHO). Cancer. Genebra. [2012]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 06 ago. 2017

XAVIER, S. D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CARVALHO, J. M.; FRAMIL, V. M. S.; CASTRO, T. M. P. P. G. Frequência de aparecimento de papilomavírus humano (HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular: diagnóstico e tratamento. Arquivo Interno de Otorrinolaringologia, São Paulo, v. 11, n. 1, p.36-44, 2007.